総説

群体性ボルボックス目（緑藻植物）の系統 ---形態学と塩基配列からの両アプローチ---

野崎久義

東京大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻・進化多様性生物学大講座
(〒113 東京都文京区本郷 7 丁目 3 番 1 号)

Hisayoshi NOZAKI: Phylogeny of the colonial Volvocales: approaches based on morphological and nucleotide sequence data

Division of Evolutionary Biology, Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Abstract

Recent phylogenetic studies of the colonial Volvocales are reviewed. They are based on morphological data of vegetative ultrastructure and life cycle or nucleotide sequence data. Comparative morphological studies of the sexual reproduction of the colonial Volvocales suggested that the four-celled species *Gonium sociale* is placed in a phylogenetic position separated from other members of the colonial Volvocales (Nozaki 1986). A cladistic analysis based on morphological data also indicated the peculiar phylogenetic position of *G. sociale* (thus transferred to another genus *Tetrabaena*) and suggested that the evolution from isogamy to anisogamy had occurred once within the colonial Volvocales (Nozaki & Itoh 1994). However, molecular phylogeny based on rRNA sequence data resolved multiple evolution of anisogamy as well as reverse evolution from anisogamy to isogamy within such organisms (Larson et al. 1992). More recent molecular phylogenetic research based on *rbcl* sequence data of the colonial Volvocales (Nozaki et al. 1995) supports the morphological study (Nozaki & Itoh 1994), with regard to the evolution of isogamy/anisogamy.

はじめに

微細藻類はクローン培養法により容易に「遺伝的に均一な材料」となりうるので様々な生物学的手法を用いて研究する事ができる。従って、微細藻類の多様性を研究する場合は、生活環・微細構造・遺伝子 DNA 等の様々な生物学的視点からのデータを駆使する事が可能となる。一方、生物の系統関係を推測する事は生物が具現する多様性の起源を認識する上で不可欠であり、分類学に於いては分類群を認識・整理する上での基本的な原理である。

私が長年研究対象としているボルボックス目 (Volvocales) の多くは 2 本の等長の鞭毛をもつクラミドモナス型の細胞からなる体制をした淡水産の緑藻類である。ボルボックス目では、構成細胞が鞭毛で遊泳する事を保持したまま、群体の細胞数の増加が認められ、この傾向を「ボルボックス傾向」(Volvocine line) と伝統的に教科書等で紹介されている。特に 500 以上の細胞をもつ *Volvox* 属及びその近縁の生物の中では、群体の細胞数の増加に伴う生殖細胞の分業化・雌雄性の発達等の傾向が認められる。従って、群体性ボルボックス目の系統を研究する事は分類学的な意義ばかりではなく、高等生物に見られる基本的な進化形質の起源を探索する事にもつながると考えられる。尚、*Volvox* の和名がオオヒゲマワリなので、Volvocales をオオヒゲマワリ目とも呼ぶ場合もある。

Volvox 属に近縁と考えられる群体性の生物は共通して、群体がゼラチン状の基質で包まれ、従来の分類体系では、ボルボックス科 (Volvocaceae) と *Astrephomene* 属のみを含むアストレフォメネ科 (Astrephomenaceae) に分類されていた (e. g. Bold & Wynne 1985) (Fig. 1)。ボルボックス科の中の *Gonium* 以外の属は基本的に放射球状の群体をもち、群体形成時に「反転 (inversion)」をする (Bold & Wynne 1985)。一方、*Astrephomene* の群体はボルボックス科と同じように放射球状であるが (Fig. 1)、群体形成時に反転をしないので、別のアストレフォメネ科となっていた。

本稿では群体性ボルボックス目の系統関係を有性生殖の生活環・微細構造上の形態学的特徴から議論してきた私自身の研究を中心に説明してゆきたい。次に本生物群の系統を核酸分子の塩基配列のデータから議論した研究を紹介し、群体性ボルボックス目の進化・系統を形態と塩基配列の両データから議論するつもりである。

群体性ボルボックス目の有性生殖

最初に私が着目したのは従来ボルボックス科に分類されていた *Gonium* 属である。ここでは、*Gonium* 属の説明の前に *Gonium* 以外の典型的なボルボックス科の生物を紹介する。ボルボックス科では同型配偶の原始的な有性生殖をするものと、配偶子が雌雄に分化した異形配偶または卵生殖のものがある。異形配偶または卵生殖の生物は *Eudorina*, *Pleodorina*, *Platydorina*, *Volvox* の4属で、共通して精子束 (sperm packet) という雄の配偶子が菊の花の様に集合した群体を形成し、休眠接合子からは一個の発芽細胞が泳ぎでる (Harris & Starr 1969, Nozaki 1983a, 1988, Nozaki et al. 1989) (Fig. 2)。

一方、*Gonium* 以外の同型配偶のボルボックス科の *Pandorina*, *Volvulina*, *Yamagishiella* の3属は接合する配偶子の両方にチューブ状の接合構造である接合突起 (mating papilla) を持ち、

1. Volvocaceae オオヒゲマワリ科

2. Astrephomenaceae アストレフオメネ科

Fig. 1.
Traditional taxonomic system
of the colonial Volvocales.
Not to scale.

Fig. 2.
Sexual reproduction in the anisogamous and oogamous genera of the
Volvocaceae. Not to scale.

papilla 同士の結合で配偶子の接合が開始し、休眠接合子から是一個の発芽細胞が泳ぎでる (Carefoot 1966, Nozaki 1982, Nozaki & Kuroiwa 1991) (Fig. 3)。また、*Astrephomene* 属もこれらのものと基本的に同じ有性生殖をする (Nozaki 1983b)。

ところが、ボルボックス科に従来分類されていた *Gonium* は数種類あるが、以上の様な有性生殖と異なり、更にその中で二つのタイプが存在することが明らかになった。第一のタイプが *Gonium pectorale* Mueller (Stein 1958, Nozaki 1984), *G. viridistellatum* Watanabe (Nozaki 1989), *G. quadratum* Pringsheim ex Nozaki (Nozaki 1993) の3種であり、栄養群体は8または16細胞性である。有性生殖では同大の2個の配偶子の鞭毛の根元にある細胞質状の接合突起同士の結合が occur することで接合が配偶子の細胞質融合が開始する。休眠接合子発芽時には、減数分裂と思われる2回の分裂がおき、4個の同大の発芽細胞が形成され、それらが一つの群体 (germ colony) となって泳ぎでる (Fig. 4)。

第2のタイプは *Gonium sociale* (Dujardin) Warming で、本種は今までに説明したものととは基本的に異なる有性生殖をする (Nozaki 1986)。*G. sociale* は4細胞性の栄養群体を持つ点でも特異である。有性生殖の時には、接合する配偶子の片方にしか接合突起を持たず、片方の突起の先端が突起のない配偶子の鞭毛の根元に結合することから配偶子は融合する。休眠接合子発芽の時には4個の2鞭毛型の発芽細胞が形成され、発芽細胞は接合子の細胞壁からばらばらで泳ぎでる (Fig. 5)。

従って、*Gonium sociale* は接合する配偶子の片方だけにしか接合突起を持たないが、他の *Gonium* の3種及び同型配偶のボルボックス科及びアストレフォメネ科の *Astrephomene* は両方の配偶子に接合突起を持つ。私は *G. sociale* の接合突起を unilateral mating papilla、他のものを bilateral mating papilla と名付けた (Nozaki 1986)。また、*G. sociale* の接合子発芽様式も両科の中で特異であり、本種がこれらの生物の中で極めて特殊な系統的位にあると議論した (Nozaki 1986)。以上の様な生活環から得られた系統的仮説を支持するデータは電子顕微鏡的な細胞構造にあると私は当時 (1986 年頃) 考え、*G. sociale* が微細構造レベルでも他のものと異なることを証明しようとした。

Fig. 3.
Sexual reproduction in the three isogamous genera of the Volvocaceae. Not to scale.

Fig. 4.
Sexual reproduction in *Gonium pectorale* Mueller, *G. viridistellatum* Watanabe and *G. quadratum* Pringsheim ex Nozaki.
Not to scale.

Fig. 5.
Sexual reproduction in *Gonium sociale* (Dujardin) Warming
[*Tetrabaena socialis* (Dujardin) Nozaki et Itoh]. Not to scale.

群体性ボルボックス目の微細構造

従って、ボルボックス科の各種の培養株を固定・包埋し、電子顕微鏡で観察したが、G. sociale の栄養細胞の微細構造は他の Gonium と殆ど区別がつかなかった。ところが、そうしているうちに Gonium 属全体が他のボルボックス科とは異なる群体の構造である事が判明してきた。すなわち、ボルボックス科の群体の構造として特徴的な事は、群体全体が tripartite boundary という筋状の構造で囲まれていることであった。この tripartite boundary は単細胞の Chlamydomonas の細胞壁の真ん中の層の構造と相同と考えられており、これらの群体は Chlamydomonas の細胞壁に相当するものが群体全体を包んでいると考えてよい。この状態を "colonial boundary" と言って、Gonium 以外のボルボックス科の生物に共通した構造であった (Nozaki & Kuroiwa 1992 を見よ)。一方、私が観察した Gonium の 6 種 (G. sociale を含む) の栄養群体は共通して、colonial boundary と基本的に異なる特徴が認められた (Nozaki 1990)。すなわち、Gonium では tripartite boundary が群体全体ではなくて、個々の細胞を包んでいた (これを "cellular boundary" と言う)。また、Astrephomene の群体の電子顕微鏡観察は Hoops & Floyd (1982) により報告されていて、Gonium と同じ cellular boundary のタイプであった。従って、ボルボックス科から Gonium 属を排除し、Astrephomene と共に一つの family (Goniaceae ゴニウム科) に分類すべきであることを提唱した (Nozaki & Kuroiwa 1992) (Fig. 6)。

群体性ボルボックス目の形態的形質に基づく分岐系統学的解析

従来、生物の系統関係は以上の様な表現形質の重み付けと生物間の異なり具合から議論されてきた。しかし近年、共有派生形質 (synapomorphy) に基づき単系統群 (monophyletic group) を探索し、生物相互の系統関係を再構築するという画期的な方法論 "系統枝解析または分岐系統学的解析 (cladistic analysis)" が Hennig (1966) によって提唱された。1970 年代には、昆虫分類学者を中

Fig. 6.
 New taxonomic system proposed by Nozaki & Kuroiwa (1992), based on difference in ultrastructure of the vegetative colonies.

心として盛んにこの方法によって形態的形質が解析され、いわゆる cladogram が作られた。しかし、対象とする種類と形質が多い場合に cladogram を構築する事は当時、非常に困難であった。ところが、多くの分類群と形質数に基づく系統枝解析を簡単に実行するコンピュータソフトが 1980 年代後半に開発された。

我々はその代表的ソフト "PAUP" を用いて、系統枝解析を群体性ボルボックス目で初めて実施した (Nozaki & Itoh 1994)。群体性ボルボックス目の有性生殖と無性生殖の形質、並びに、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した栄養群体の形質、合計 41 組の形態的形質状態を基に、PAUP 3.0 computer program で cladogram を構築した。尚、アウトグループには単細胞の *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた。*C. reinhardtii* は unilateral mating papilla に相当する接合突起を持ち、4 個の発芽細胞がばらばらとなって泳ぎで有性生殖をする。

PAUP で 最小の形質置換の cladogram が 144 個認められ、それらより厳密合意樹 (strict consensus tree) を構築した結果が Fig. 7 である。まず、大きな二つの単系統群の存在が示唆された。第一のグループには *Gonium sociale* 以外のゴニウム科のものがすべて含まれていた。第二の単系統群はボルボックス科に所属するすべてのものから成っていた。第一のゴニウム科に相当する系統群の単系統性を支持する派生形質 (apomorphy) の可能性としては、接合子から四細胞性の germ colony が発芽する事等 3 個が示唆された。一方、ボルボックス科に於いては colonial boundary、一細胞の接合子発芽を含めた 4 種の共有派生形質が同時に示唆された。従って、*Gonium* を除いたボルボックス科の単系統性は確実な事と思われた。

一方、四細胞性の *Gonium sociale* はゴニウム科とボルボックス科の両科から成る単系統群に対する sister group であることが系統枝解析で示唆された (Nozaki & Itoh 1994)。従って、*G. sociale* にはゴニウム科及びボルボックス科とは別の属及科が必要と考えられ、新組み合わせ *Tetrabaena socialis* (Dujardin) Nozaki et Itoh と *Tetrabaena* 属をタイプとする新しいテトラバエナ科 (Tetrabaenaceae) を提案した。また、我々の系統枝解析の結果から、ボルボックス科の中では同型配偶から異形配偶への進化が群体の細胞数の増加と共に認められ、この進化は精子束の発達に伴って一回だけ起きたものと考えられた (Fig. 8)。

群体性ボルボックス目の塩基配列データに基づく系統解析

生物の系統関係を遺伝子の塩基配列から解析する手法が近年比較的容易になり、多くの分類関係の研究者が系統解析で用いる様になった。1980 年代後半にアメリカの研究者を中心としては細胞から抽出したリボソーム (r)RNA にプライマーを用いて直接、rRNA の部分塩基配列が解読される様になり、多くの生物群で rRNA の分子系統樹が作成された。1990 年代になると、PCR 法による特定遺伝子の DNA の増幅と direct sequence 法の発展により、大量の遺伝子の塩基配列の解読が容易となった。また、分子データで系統解析を実施する各種コンピュータソフトが開発され、簡単に研究者に配布されるようになった。その結果、様々な生物群で遺伝子 DNA の分子系統樹が作成される様になった。特にここ 2、3 年の全自動 DNA シーケンサーの普及は "RI を使用しない" 安全・容易な分子分類" を可能にした。ここでは群体性ボルボックス目の系統関係を分子データで解析した 2 つの研究例を紹介し、前述の形態学的データに基づくものと比較検討してゆきたい。

第一に、アメリカの Larson et al. (1992) によって 18S と 26S rRNA の部分塩基配列が解読され、

Fig. 7. Strict consensus tree for 144 equally parsimonious trees of the colonial Volvocales constructed using morphological characters (based on Nozaki & Itoh 1994).

群体性ボルボックス目の系統関係が推測された。Fig. 8 の上部は Larson et al. (1992) の rRNA 系統樹である。この系統樹において注目すべき点は異形配偶・卵生殖のボルボックス科の 32 以上の細胞の群体をもつ *Pleodorina*、*Volvox* 及び *Eudorina* が構成する系統群が 2 個あり、片方の中にゴニウム科の *Gonium pectorale* が含まれていることである。一方、ボルボックス科の同型配偶で 16 細胞性の *Pandorina* と *Volvulina* がもう片方の系統群の末端に位置している。すなわち、*Eudorina*、*Volvox* の次に *Pandorina* と *Volvulina* が出現している。これは細胞数の減少に伴う異形配偶から同形配偶への逆行的進化の可能性を示唆している。これらの結果は形態学的データに基づく我々の解析結果 (Nozaki & Itoh 1994) と基本的に異なり (Fig. 8)、本生物群の系統関係を別個のデータから解析する事が必要と考えられた。

一般的に一種類の遺伝子の塩基配列だけを基にした遺伝子系統樹で生物の系統関係を推測する事はそれぞれの遺伝子の進化の特殊性があるために好ましくないとされている。また、rRNA を支配する遺伝子は多重遺伝子族を構成する為、遺伝子の転換または不均等な交叉があり不自然な系統関係を導く可能性のあるものとされている。従って、我々は別個のデータとしてタンパク質コード遺伝子の塩基配列の情報が群体性ボルボックス目の系統解析上有効で必要と考えた。

Larson et al., Mol. Biol. Evol. 9: 85-105, 1992

Nozaki & Itoh, J. Phycol. 30: 353-365, 1994

Fig. 8.
Comparison of two phylogenetic trees of the colonial Volvocales.

Fig. 9.
One of two equally parsimonious tree based on aligned nucleotide sequences for 1128 base pairs of the colonial Volvocales and 3 unicellular volvocalean species (based on Nozaki et al. 1995). Numbers above branches indicate minimal numbers of nucleotide changes. Numbers below branches indicate the bootstrap values based on 1000 replications. Only a single monophyletic group (asterisk) was not resolved in the other parsimonious tree.

そこで、我々は *rbcL* という葉緑体ゲノム上のタンパク質コード遺伝子の 1,128 塩基対を群体性ボルボックス目 3 科 20 種で PCR 法と direct sequence 法を用いて解読し、それらを基に系統関係を推測した (Nozaki et al. 1995)。その結果の最節約系統樹が Fig. 9 ある。枝の上部の数値は最小塩基置換数で、枝の下部の数値は 1,000 回の bootstrap による 50% 以上の値である。この系統樹では、ボルボックス科の異型配偶の属 *Eudorina*、*Pleodorina* 及び卵生殖の *Volvox* の総ての種が大きな単系統群を形成している。更に *Volvox rousseletii* Pocok 以外の異型配偶・卵生殖の生物が高いブートストラップ値 (97%) で支持される単系統群を形成している。従って、形態形質による解析結果と同様に、群体性ボルボックス目に於ける精子束の獲得による同型配偶から異型配偶への進化は多分一回で、Larson et al. (1992) が示した様な *Eudorina-Volvox* 様の異型配偶・卵生殖の生物から同型配偶への”逆進化”はない事を示している。

しかし、この系統樹ではボルボックス科及びゴニウム科の単系統性は支持されなかった。更にボルボックス科は同型配偶と異型配偶の多系統群となっている。一方、ゴニウム科の *Gonium pectorale* 以外の *Gonium* と *Astrephomene* は bootstrap 値は低いものの単系統群を形成している。また、*Tetrabaena* と *Basichlamys* が形成するテトラバエナ科 (Nozaki et al. 1996 を見よ) はボルボックス科及びゴニウム科の両科からなる単系統群の姉妹群として解析され (Fig. 9)、形態的データから示唆された *Tetrabaena socialis* 即ち *Gonium sociale* の特殊な系統的位置が *rbcL* の塩基配列からも示唆された。しかし、これらの”高い bootstrap 値で支持されない系統関係”は否定または信頼するには情報量不足であり、今後より多くの塩基配列のデータが必要と考えられる。

さいごに

現在では、マクロの形態と遺伝子の塩基配列と言う全く性質の異なるものから系統関係を推測する事ができる。一般的には遺伝子の塩基配列のデータは客観的で情報量が多く、系統関係の推測には有効であると言われている。また、私の研究してきた群体性ボルボックス目では形態的データを蓄積するのに約 15 年かかった。一方、*rbcL* の遺伝子系統樹の方は私自身が PCR 法を習い初めてから約一年で 20 種のデータが出揃った。この様な訳で、系統関係を推測すると言う事であれば、時間のかからない塩基配列のデータを用いる研究論文が最近非常に多くなってきた。日本植物学会第 59 回大会 (1995) の第 1 日目の午後の分類のセッションでは演題のほとんどが塩基配列データを用いたものとなった。言い替えれば、各大学・研究所で全自動 DNA シーケンサーが普及したということでもある。

話を元に戻せば、系統関係を推測する目的は最初に述べた様に生物がもたらす多様性の起源を認識する事である。更に、ここで言う”多様性”とは生物の個体・細胞レベルがもたらす形態を中心とする”表現形質の多様性”であると私は考える。従って、私が 15 年かけて蓄積した群体性ボルボックス目の光学顕微鏡レベルの生殖様式のデータは”多様性”そのものであり、それらが系統解析には有効でないと将来において結論されても群体性ボルボックス目が生物学の対象である限り生き残るものと信じる。

引用文献

- Bold, H. C. & Wynne, M. J. 1985. *Introduction to the Algae*. 2nd edn. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 720 pp.
- Carefoot, J. R. 1966. Sexual reproduction and intercrossing in *Volvox steinii*. *J. Phycol.* 2: 150-156.
- Harris, D. O. & Starr, R. C. 1969. Life history and physiology of reproduction of *Platydorina caudata* Kofoed. *Arch. Protistenk.* 111: 138-155.

- Hennig, W. 1966. Phylogenetic Systematics. Univ. Illinois Press, Urbana, 263 pp.
- Hoops, H. J. & Floyd, G. L. 1982. Mitosis, cytokinesis and colony formation in the colonial green alga Astrephomene gubernaculifera. Br. Phycol. J. 17: 297-310.
- Larson, A., Kirk, M. M. & Kirk, D. L. 1992. Molecular phylogeny of the volvocine flagellates. Mol. Biol. Evol. 9: 85-105.
- Nozaki, H. 1982. Gamete conjugation in Pandorina (Chlorophyta, Volvocales) with particular reference to the mating papilla. Jpn. J. Phycol. 30: 303-304.
- Nozaki, H. 1983a. Sexual reproduction in Eudorina elegans (Chlorophyta, Volvocales). Bot. Mag. Tokyo 96: 103-110.
- Nozaki, H. 1983b. Morphology and taxonomy of two species of Astrephomene (Chlorophyta, Volvocales) in Japan. J. Jpn. Bot. 58: 345-352.
- Nozaki, H. 1984. Newly found facets in the asexual and sexual reproduction of Gonium pectorale (Chlorophyta, Volvocales). Jpn. J. Phycol. 32: 130-133.
- Nozaki, H. 1986. Sexual reproduction in Gonium sociale (Chlorophyta, Volvocales). Phycologia 25: 29-35.
- Nozaki, H. 1988. Morphology, sexual reproduction and taxonomy of Volvox carteri f. kawasakensis f. nov. (Chlorophyta) from Japan. Phycologia 27: 209-220.
- Nozaki, H. 1989. Morphological variation and reproduction in Gonium viridistellatum (Volvocales, Chlorophyta). Phycologia 28: 77-88.
- Nozaki, H. 1990. Ultrastructure of the extracellular matrix of Gonium (Volvocales, Chlorophyta). Phycologia 29: 1-8.
- Nozaki, H. 1993. Asexual and sexual reproduction of Gonium quadratum (Chlorophyta) with a discussion of phylogenetic relationships within the Goniaceae. J. Phycol. 29: 369-376.
- Nozaki, H. & Itoh, T. 1994. Phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta) inferred from cladistic analysis based on morphological data. J. Phycol. 30: 353-365.
- Nozaki, H., Itoh, M., Sano, R., Uchida, H., Watanabe, M. M. & Kuroiwa, T. 1995. Phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta) inferred from rbcL gene sequence data. J. Phycol. 31: 970-979.
- Nozaki, H., Itoh, M., Watanabe, M. M. & Kuroiwa, T. 1996. Ultrastructure of the vegetative colonies and systematic position of Basichlamys (Volvocales, Chlorophyta). Eur. J. Phycol. 31 (1): in press.
- Nozaki, H. & Kuroiwa, T. 1991. Pandorina colemaniae sp. nov. (Volvocaceae, Chlorophyta) from Japan. Phycologia 30: 449-457.
- Nozaki, H. & Kuroiwa, T. 1992. Ultrastructure of the extracellular matrix and taxonomy of Eudorina, Pleodorina and Yamagishiella gen. nov. (Volvocaceae, Chlorophyta). Phycologia 31: 529-541.
- Nozaki, H., Kuroiwa, H., Mita, T. & Kuroiwa, T. 1989. Pleodorina japonica sp. nov. (Volvocales, Chlorophyta) with bacteria-like endosymbionts. Phycologia 28: 252-267.
- Stein, J. R. 1958. A morphologic and genetic study of Gonium pectorale. Am. J. Bot. 45: 664-672.